AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT WÜRZBURG

Direktor: Professor Dr. med. H. Franke

Beziehung zwischen Serumalbumingehalt und Esteraseaktivität des Blutes

INAUGURAL-DISSERTATION

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Alois Schuhmann

aus

Bad Neustadt / Saale

Würzburg

1956

Referent: Professor Dr. med. A. Franke

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündl. Prüfung:
19. September 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Meinen verstorbenen Eltern!

Beziehung zwischen Serumalbumingehalt und Esteraseaktivität des Blutes

Für die klinische Bewertung der Esteraseaktivität des Blutes ist es von größter Wichtigkeit, daß man die einzelnen Esterasen je nach dem gewählten Substrat getrennt auf ihr Ansprechen bezüglich der jeweiligen pathologischen Zustände untersucht. Die klinischen Ergebnisse mit der klassisch gewordenen Lipasebestimmung nach Rona und Michaelis durch Messung der Oberflächenspannungsänderung bei Spaltung von Glycerinbuttersäureester (Tributyrin) sind nicht zu übertragen auf das Ansprechen der mit moderneren Substraten durchgeführten Methoden bei den gleichen Krankheitszuständen.

Zur analytischen Bestimmung von Esterasen benutzt man immer mehr solche Substrate, bei deren enzymatischen Spaltung neben der Säurekomponente ein Alkohol frei wird, der sich exakt auf photometrischem Wege erfassen läßt. So sind z. B. bekannt zur Bestimmung der Phosphatasen das Phenolphthaleinphosphat, Phenoldiphosphat und das p-Nitrophenolphosphat, für die β-Glucuronidase das Phenolphthaleinglucuronid, und auch für die eigentlichen Esterasen, also für die Fermente, welche Carbonsäureester spalten, kennt man derartige Substrate wie z. B. den p-Nitrophenolcarbonsäureester oder das von Seligman und Nachlas (1) empfohlene β-Naphthyllaurat.

1951 hat Purr (2) zur photometrischen Esterase-Bestimmung das Phenolphthaleindibutyrat angegeben und für die Messung der esterspaltenden Eigenschaft von Bakterien und Geweben verwendet. Diese Methode wurde von Ruppert (3) aufgegriffen und für klinische Zwecke ausgearbeitet, indem er eine colorimetrische Mikromethode zur Esterasebestimmung im Blut angab. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß in dem durch Puffer verdünnten Plasmaanteil von 0,1 ml Kapillarblut oder von 0,05 ml Serum 0,1 ml methanolische Phenolphthaleindibutyratlösung suspendiert wird. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37° wird mit Trichloressigsäure inaktiviert und die durch die Esterase abgespaltene Phenolphthaleinmenge im Filtrat colorimetrisch gemessen.

Mit dieser colorimetrischen Methode ist es möglich, die Esterasen auch noch in so kleinen Proteinfraktionen zu messen, wie sie bei der Elektrophorese auf dem Papierstreifen gebildet werden. Nach den Untersuchungen von Ruppert (4) findet sich dabei die Esterasewirkung fast ausschließlich in der Albuminfraktion, während früher Rona und Michaelis bei stalagmometrischen Messungen der Tributyratspaltung eine Lokalisation der Lipase in der Globulinfraktion feststellten (Fraktionierung der Serumproteine durch Ausfällung mit Natriumsulfat).

Dieser andersartige Befund von Ruppert (4) mit Phenolphthaleindibutyrat als Substrat war begründeter Anlaß, die Verwendbarkeit dieser neuen colorimetrischen Methode an einem größeren klinischen Krankenmaterial zu überprüfen, um dabei eventuell neue diagnostische Gesichtspunkte zu gewinnen. Dabei fiel auf, daß sich Esteraseerniedrigungen vorwiegend in solchen Fällen zeigten, die im Serum auch eine Verminderung der Albuminfraktion aufwiesen. Dies bestätigte zunächst auch von der klinischen

Seite her die Lokalisation der esterspaltenden Aktivität des Serums in der Albuminfraktion des Serumproteins.

Das Ziel vorliegender Arbeit soll darin liegen, an Hand einer größeren klinischen Untersuchungsreihe festzustellen, ob die Albuminverminderung im Serum immer auch von einer Verminderung der Esteraseaktivität gefolgt sei und ob sich dann diese beiden Werte parallel verhielten. Damit würde der praktische Nutzen einer Esterasebestimmung mit dieser Methode neben der Feststellung des Serumalbumingehaltes hinfällig geworden sein.

I. Methodik

a) Gesamtprotein des Serums.

Nach kjeldahlometrischer Bestimmung des Gesamtstickstoffes im Serum errechnet sich durch Abzug des Reststickstoffes der Proteinstickstoff. Multiplikation mit dem Faktor 6,25 ergibt das Gesamtprotein des Serums.

b) Elektrophoretische Bestimmung des Serumalbumins.

Verwendet wurde die Papierelektrophorese nach Grassmann und Hannig in der Elphor-Apparatur der Fa. Bender & Hobein, München. Auswertung der Streifen mit Photozelle und Planimetrieren der Kurven.

c) Bestimmung der Serumesterase nach der colorimetrischen Mikromethode von Ruppert.

0,1 ml frisches Serum werden in 5,0 ml Borax-Phosphatpuffer (pH 9,0) eingetragen und von der Mischung zum Parallelansatz in 2 Zentrifugengläser je 1,0 ml einpipettiert. Als Leerwerte laufen 2 Ansätze mit je 1,0 ml reinen Boraxphosphatpuffer mit. Man gibt in alle Röhrchen mit der Blutzuckerpipette 0,1 ml der Substratlösung (50 mg Phenolphthaleindibutyrat in 10,0 ml Methanol), verschließt mit einem Kunststoffstopfen und inkubiert 24 Std. bei genau 37 °C (± 0,2 °C) im Thermostaten. Dann gibt man zu den Röhrchen des Fermentansatzes je 1,0 ml reinen Borax-Phosphatpuffer, zu den Röhrchen des Leerwertes dagegen 1,0 ml der Serum- Puffermischung. Man versetzt alle Gläschen mit je 1,0 ml 20 %iger Trichloressigsäure und läßt ca. 10 Min. stehen. Dann zentrifugiert man scharf und pipettiert von der klaren, abdekantierten Flüssigkeit je 2,0 ml in ein 10 ml-Meßkölbchen, neutralisiert mit ca. 10 %iger Natronlauge bis zur schwachen Rosafärbung und füllt die Kölbchen mit Glykokoll-Natronlaugepuffer von pH 11,2 bis zur Marke auf. Messung der Rotfärbung am Elko II (Fa. Carl Zeiss) in 2 cm-Küvetten bei Filter S 55 gegen den Leerwert.
Zur Errechnung des Esterasewertes multipliziert man die Extinktionsdifferenz zwischen Fermentwert und Leerwert mit dem Faktor 128. Die erhaltene Zahl gibt die von 100 ml Serum nach obiger Arbeitsweise in 24 Std. abgespaltene Phenolphthaleinmenge an.

Normalbereiche.

1. In Übereinstimmung mit der Weltliteratur wird für den Bereich des Gesamtproteins im Serum von Normalpersonen 6,5 — 8,0 g% zu Grunde gelegt.
2. Die papierelektrophoretische Bestimmung der Albuminfraktion nach der Methode von Grassmann und Hannig ergab einen Bereich von 50 — 58 % im Serum von Normalpersonen.

3. Die Esterasebestimmung im Serum von Normalpersonen ergab einen Extinktionsbereich von E = 0,350 — 0,460 (entsprechend einem Esterasewert 45 — 60).

Die zur Untersuchung gelangten Seren wurden spätestens 6 Stunden nach der Blutentnahme in Bearbeitung genommen. In diesem Zeitraum bleibt die Esteraseaktivität des Serums stabil.

II. Ergebnis der Untersuchungen

Die angeführten Bestimmungen wurden an 155 Patienten durchgeführt, die an den verschiedensten Krankheiten litten (Hepatopathien, Carcinome, Polyarthritis, Nephrose, Leukämien, Ulcus ventriculi und duodeni, Cardiopathien etc.). Trägt man nun die Esterasewerte (Extinktion der Ablesungen) in einem Koordinatensystem gegen das Serumalbumin auf und zwar einmal gegen den relativen Albumingehalt in %, das andere Mal gegen den absoluten Albumingehalt in g%, so erhält man die folgenden Beziehungen dieser Serumwerte zueinander, wie sie in Abb. 1 und 2 dargestellt sind:

(Zwischen den gestrichelten Linien liegt der Normalbereich für Serumalbumin und Esterasewerte)

Abbildung 1

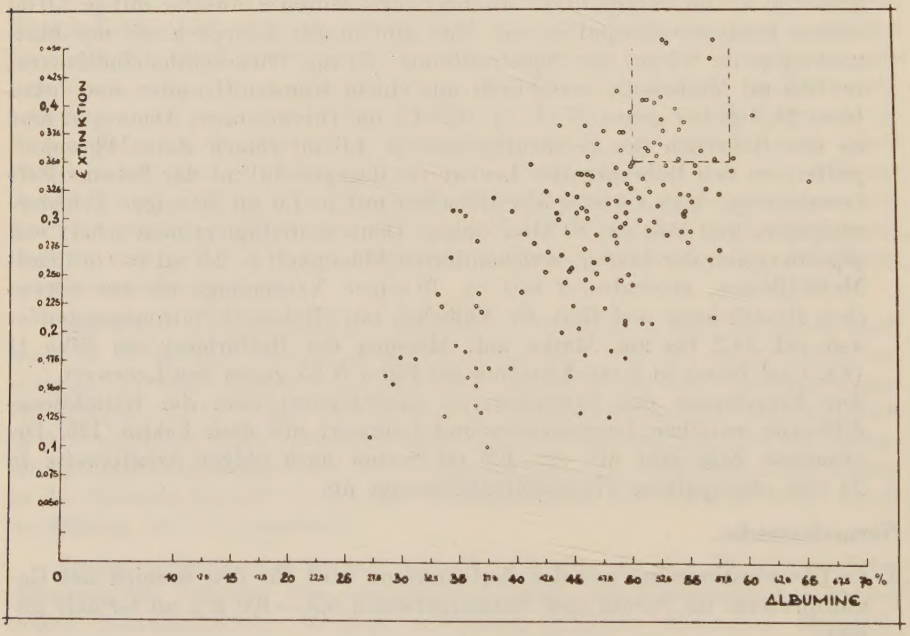

Abb. 1: Beziehung des Extinktionswertes der Serumesterase (Phenolphthaleindibutyrat als Substrat) gegen das Serumalbumin (relativer Gehalt in Prozenten).

Abbildung 2

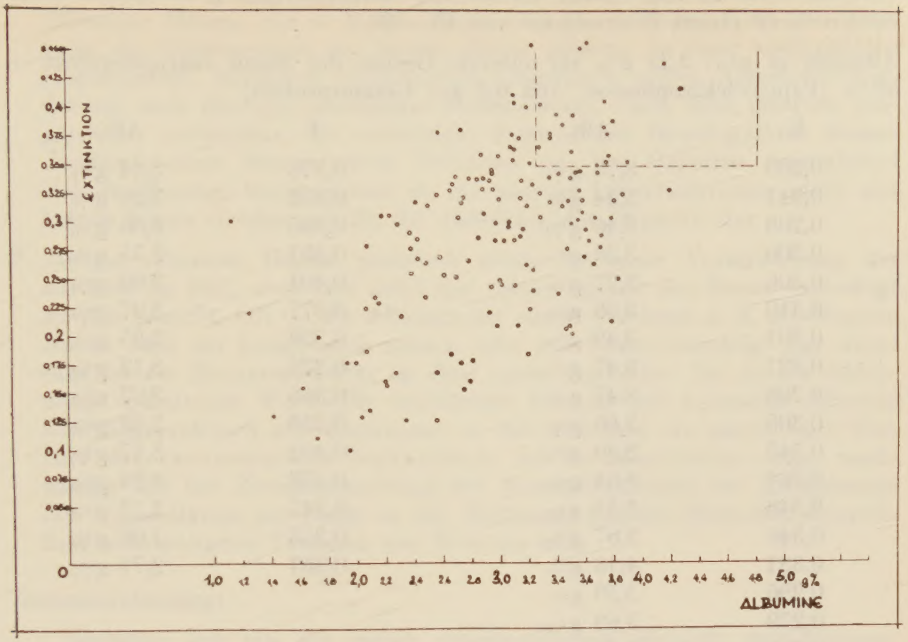

Abb. 2: Beziehung des Extinktionswertes der Serumesterase (Phenolphthaleindibutyrat als Substrat) gegen das Serumalbumin (absoluter Gehalt in g%).

III. Besprechung der Ergebnisse:

Man kann aus diesen Abbildungen zunächst recht deutlich erkennen, daß sich im allgemeinen mit dem Absinken des Albumins im Serum auch die Esteraseaktivität erniedrigt und zwar zeigt sich im Prinzip das gleiche Bild, ob man das Serumalbumin in Prozentanteil am Gesamteiweiß oder in absoluten g% angibt.

Auf der anderen Seite erkennt man aus den Abbildungen, daß das Verhältnis zwischen Serumesterase und Serumalbumin keine lineare Funktion darstellt. sondern es ergibt sich eine Punktwolke mit einem großen Streubereich um eine als ideal gedachte Gerade. Dies besagt, daß doch keine direkten gesetzmäßigen Beziehungen zwischen diesen Werten bestehen. Zur näheren Kennzeichnung seien z. B. in folgender Tabelle einige extreme Wertpaare aufgezeigt:

Tabelle

Normales Albumin mit erniedrigten Esterasewerten		Normale Esterasewerte bei erniedrigtem Albumin	

(Esterasewerte in abgelesener Extinktion, Normalbereich E = 0,350 — 0,460 entsprechend einem Esterasewert von 45 — 60.

Albumin in g%; 3,25 g% als unterste Grenze der Norm zugrundegelegt = 50 % (Papierelektrophorese) von 6,5 g% Gesamtprotein)

E	Alb.	E	Alb.
0,289	3,70 g%	0,376	3,14 g%
0,341	3,34 g%	0,352	3,20 g%
0,208	3,46 g%	0,365	3,06 g%
0,306	3,26 g%	0,381	2,55 g%
0,306	3,77 g%	0,404	3,09 g%
0,310	3,56 g%	0,377	3,07 g%
0,301	3,49 g%	0,359	2,85 g%
0,321	3,47 g%	0,375	3,12 g%
0,208	3,47 g%	0,366	3,07 g%
0,305	3,66 g%	0,359	2,89 g%
0,345	3,40 g%	0,402	3,17 g%
0,264	3,64 g%	0,458	3,21 g%
0,348	3,51 g%	0,347	2,73 g%
0,346	3,67 g%	0,355	3,08 g%
0,331	4,18 g%	0,381	2,71 g%
0,296	3,59 g%		
0,279	3,69 g%		
0,303	3,54 g%		
0,214	3,77 g%		
0,313	3,27 g%		
0,340	3,44 g%		
0,203	3,50 g%		
0,318	3,34 g%		
0,329	3,54 g%		
0,320	3,79 g%		
0,320	3,57 g%		
0,285	3,61 g%		
0,325	3,85 g%		
0,315	3,45 g%		
0,272	3,58 g%		
0,278	3,46 g%		
0,238	3,40 g%		
0,346	3,55 g%		

Betrachtet man die klinischen Bilder, die den einzelnen Konstellationen zwischen Serumesterase und Albumin zuzuordnen sind, so zeichnen sich 3 grundsätzliche Gruppierungen ab:

1. Bei Krankheiten, die mit einer Vermehrung der a_2-Globulinfraktion (akute Entzündungsphase) oder der γ-Globulinfraktion (chronische Entzündungsphase) bzw. der Mischform aus a_2- und γ-Globulinvermehrung einhergehen, ohne daß eine Lebererkrankung zugrundeliegt, und die dementsprechend

zu einer mehr oder minder deutlichen Verminderung der Albumine führen, bleiben die Serumesterasewerte im Bereich der Norm oder bewegen sich an der unteren Grenze der Norm.

2. Krankheiten, die auf Grund ihrer Ätiologie direkt zur Verminderung der Albumine führen, wie z. B. die Hepatopathien, bedingen auch eine Senkung der Esterasewerte im Serum. Daher gehören zu einer ausgeprägten Hepatopathie, besonders cirrhotischen Charakters, neben Albuminverminderung auch deutlich erniedrigte Esterasewerte. Diese sind insofern prognostisch verwertbar, als erniedrigte Esterase bei Hepatopathien immer Ausdruck eines degenerativen Prozesses ist; bei Hepatitis normalisiert sich die Esterase meist rascher als die anderen Leberfunktionen, stellt also keinen feinen Gradmesser für die Abheilung der Hepatitis dar.

3. Maligne Prozesse führen praktisch immer zu einer Verminderung der Esterase im Blut, ohne daß dabei der Albumingehalt des Serum erniedrigt zu sein braucht. Oft ist das Albumin bei einem Carcinom z. B. des Magens, Darms oder der Lunge noch normal oder nur leicht erniedrigt und trotzdem ist die Esteraseaktivität im Blut stark abgefallen. Die in der Abbildung enthaltenen Werte für erniedrigte Esterase bei normalem Albumin bedeuten praktisch alle Carcinome, so daß sich hier ein spezifischer Einfluß des carcinomatösen Stoffwechsels auf die Blutesterase zeigt, unabhängig von der Zusammensetzung der Proteinfraktionen bei Malignomen. Die Konstellation berechtigt zu der Hoffnung, bei der klinischen Beurteilung von malignen Tumoren von Wert zu sein.

Zusammenfassung:

Nachdem sich mit der neuen colorimetrischen Methode der Esterasebestimmung nach Ruppert gezeigt hatte, daß die Esterasewirkung im Blut der Albuminfraktion zuzuordnen sei und ferner auch klinisch häufig eine Beziehung zwischen Krankheiten mit vermindertem Serumalbumin und einer Esterasevermindерung besteht, erschien es als Ziel dieser Arbeit notwendig, durch gleichzeitige elektrophoretische Albuminbestimmung und Messung der Serumesterase von einer größeren Zahl poliklinischer Fälle die Beziehung dieser beiden Größen zueinander zu untersuchen.

Die in den beiden Abbildungen mitgeteilten Ergebnisse von 155 Fällen zeigen, daß im Prinzip mit fallendem Albumingehalt des Serums auch die Esterasewerte absinken, daß aber andererseits keine strenge Korrelation besteht. Allein 30 Fälle boten bei Zugrundelegung des prozentualen Albuminanteils im Serum von mindestens 50 % (papierelektrophoretisch) eine Verminderung der Esterase bei noch normalem Albuminanteil, während bei Zugrundelegung des g%-Gehaltes an Albumin im Serum bei einem Wert von 3,25 g% als unterster Grenze der Norm 34 Fälle eine Esteraseerniedrigung zeigten. In diese Gruppe fallen vornehmlich Carcinome, die noch nicht zu einer Albuminverminderung geführt haben, aber fast durchweg den Esterasespiegel erniedrigen. Anderseits gibt es auch Fälle mit normaler Esteraseaktivität des Serums bei erniedrigtem Albumingehalt.

Es läßt sich folgern, daß keine direkte Korrelation zwischen dem Albumingehalt des Serums und dessen Esteraseaktivität, gemessen mit Phenolphthaleindibutyrat, besteht, daß vielmehr das häufige Zusammenfallen einer Albuminverminderung mit Esterasevermindерung darauf beruht,

daß die zur fast regelmäßigen Esteraseerniedrigung führenden malignen Tumoren und Hepatopathien auch einen mehr oder minder starken Grad von Dysproteinämie mit Erniedrigung des Albumins aufweisen. Daher behält die Esterasebestimmung ihre klinische Bedeutung unabhängig von der Feststellung des Albumingehaltes des Serums.

Literatur:

1. Seligman u. Nachlas: J. clin. Invest. 29, 1950: 31
2. Purr: Biochem. Zeitschrift 322, 1951: 205
3. Ruppert, A.: Das Ärztl. Laboratorium 2, 1956: 168
4. Ruppert, A.: Vortrag Symposium Sint Jans Hospital Brügge, Mai 1956.

Es ist mir eine Pflicht, Herrn Professor Dr. H. Franke für die Überlassung des Themas zu danken.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Dr. Ruppert für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Labor und für die zur Abfassung nützlichen Hinweise.

Lebenslauf

Am 11. April 1928 wurde ich, Alois Schuhmann, als Sohn des Installations- und Spenglermeisters Hieronymus Schuhmann und seiner Ehefrau Rosa, geb. Jeßberger, in Bad Neustadt/Saale geboren. Hier besuchte ich ab Ostern 1934 die Volksschule bis ich 1939 in die Städt. Oberschule für Jungen übertrat. Diese besuchte ich bis zur Einberufung als Luftwaffenhelfer im Frühjahr 1944. Nach dem Kriege war ich von 1946 bis 1948 Schüler des kgl. Gymnasiums Münnerstadt. Mein letztes Schuljahr verbrachte ich im Wittelsbacher Gymnasium in München, wo ich im Sommer 1949 die Reifeprüfung ablegte.

Für das Wintersemester 1949/50 erhielt ich die Zulassung zum naturwissenschaftl. Studium an der Phil.-Theol. Hochschule in Bamberg.

Durch den Tod meiner Mutter mußte ich mein Studium bis zum Wintersemester 1950/51 unterbrechen. Für dieses Semester bekam ich die Zulassung zum zahnmedizinischen Studium der Universität Würzburg. Hier bestand ich im April 1952 das Physikum. Nach vier klinischen Semestern begann ich im Frühjahr 1954 mein zahnmedizinisches Staatsexamen, das ich am 18. September 1954 beendete. Von da an war ich als selbständiger Vertreter in der zahnärztlichen Praxis tätig.

Vom 1. November 1955 bis 20. März 1956 war ich mit der Abfassung der vorliegenden Arbeit beschäftigt. Seitdem bin ich als Assistent in einer zahnärztlichen Praxis in Füssen im Allgäu tätig.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Alois Schuhmann